

ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДА LYS-GLU-TRP НА МЕЖКЛЕТОЧНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ И ПРОЛИФЕРАЦИЮ ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ В НОРМЕ И ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ

В.В.Малинин, А.О.Дурнова*, В.О.Полякова*, И.М.Кветной*

*Медико-биологический научно-производственный комплекс "Цитомед"; *ФГБУ НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О.Отта СЗО РАМН, Санкт-Петербург*

В основе молекулярного механизма развития атеросклероза лежит снижение экспрессии сигнальных молекул коннексина (Cx37, Cx40), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и пролиферативного белка Ki-67, характеризующих процессы межклеточных взаимодействий и пролиферацию эндотелиоцитов сосудов. Пептид Lys-Glu-Trp в концентрациях 4 и 40 мкг/мл способствовал восстановлению экспрессии маркеров Cx37, Cx40, VEGF в культуре эндотелиоцитов аорты, полученной от пациентов с атеросклерозом, что указывает на его вазопротективные свойства.

Ключевые слова: атеросклероз, эндотелий, коннексин, фактор роста эндотелия сосудов, трипептид

Одной из наиболее распространенных видов сердечно-сосудистой патологии является атеросклероз, лежащий в основе ИБС и приводящий к тяжелым осложнениям в виде инфаркта миокарда и хронической сердечной недостаточности. Существующие лекарственные препараты зачастую лишь нивелируют симптомы атеросклероза, но не оказывают таргетного фармакологического действия на ключевые звенья патогенеза заболевания. В связи с этим для разработки новых эффективных средств в борьбе с атеросклеротическим поражением сосудов необходимо понимание основ его патогенеза.

Важной проблемой патогенеза атеросклероза является молекулярная характеристика эндотелия сосудов, который активно вовлекается в нарушение метаболизма основного вещества и белков (эластина, коллагена) в сосудистой стенке [5]. Эти изменения могут возникать даже на ранних стадиях атеросклеротического процесса, предшествуя накоплению липидов в стенке артерий. Одними из ключевых сигнальных молекул сосудистой стенки и ее патологии являются кон-

нексина (Cx), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и пролиферативный белок Ki-67.

Коннексины представляют собой мембранные белки, образующие канал, осуществляющий молекулярные взаимодействия между клетками. Коннексины являются тканеспецифичными белками: для сердечно-сосудистой системы характерными белками этой группы являются Cx37 и Cx40 [6,7]. С Cx43 взаимодействуют киназы, β -катенин, дребрин, тубулин, кавеолин-1 и др. Белок дребрин взаимодействует с коннексинами и с микрофиламентами, что указывает на взаимосвязь каналов и организации цитоскелета клетки. Известно, что мутации в генах, кодирующих Cx40, могут лежать в основе сердечно-сосудистой патологии [1]. Показано, что повышенная экспрессия Cx40, сопутствующая операции на сердце, может являться предвестником послеоперационной фибрилляции предсердий [8,9].

Транскрипционный фактор Ki-67 является маркером пролиферативной активности клеток. Пациенты с атеросклерозом аорты и артерий нижних конечностей имеют высокий уровень пролиферативной активности по сравнению с пациентами без атеросклероза [11]. Пролиферативная активность эндотелиальных и гладкомышечных

клеток стенки аорты, агрессивность и активность атеросклероза у больных с тромботическими ретро-окклюзиями в отдаленном послеоперационном периоде превышает таковую у больных без тромбозов и способствует наступлению данного осложнения после операции [3].

Другой сигнальной молекулой — маркером развития атеросклероза — является VEGF, который индуцирует пролиферацию клеток эндотелия и сосудистую проницаемость [4, 10].

Целью данной работы являлось изучение влияния пептида Lys-Glu-Trp [2] на экспрессию сигнальных молекул — маркеров межклеточных взаимодействий и пролиферативной активности — в клетках эндотелия сосудов пациентов с атеросклерозом.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Материал аорты без патологических изменений был получен от эмбриона человека (21 нед гестации) в НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О.Отта РАМН. Ткань атеросклеротической аорты человека (4 фрагмента диаметром 0,2 см) была получена при операции аортокоронарного шунтирования. Материал брали в стерильных условиях и помещали в стерильную емкость с физиологическим раствором.

Путем ферментативной диссоциации (коллагеназа) из материала аорты была получена первичная культура ткани эндотелия. Выделение первичной культуры проводилось на чашках Петри ("Sarstedt"), обработанных раствором фибриногена ("Gibco"); последующее культивирование проводилось во флаконах с обработанной поверхностью объемом 50 мл (25 см²; "Sarstedt").

Среда для культивирования клеток содержала 87,5% M199, 10% фосфатно-солевого буфера, 1,5% HEPES, 1% PES (phenazine ethosulfate) и L-глутамин. Пассирование клеток проводили через 3 сут на 4-е, посевная концентрация составляла примерно 3×10^5 клеток на флакон. Культивирование проводили до 3-го пассажа (для эндотелия, пораженного атеросклерозом) и до 7-го пассажа (для нормального эндотелия), на которых клетки рассеивали на 24-луночный планшет для иммуноцитохимического окрашивания.

Все культуры (нормального и пораженного атеросклерозом эндотелия) были разделены на 3 группы: 1-я — контроль (без введения пептида), 2-я — с добавлением пептида в концентрации 4 мкг/мл, 3-я — в концентрации 40 мкг/мл.

Для иммуноцитохимического исследования использовали первичные моноклональные антитела к маркерам Cx37 (1:20; "Abgent"), Cx40

(1:100; "Abcam"), VEGF (1:50; "Dako"), Ki-67 (1:50; "Dako") и вторичные антитела — биотинилированные антимышьи иммуноглобулины. Пермеабиллизацию проводили с применением 0,5% Тритона X-100. Визуализацию реакции выполняли с применением пероксидазы хрена и диаминобензидина ("EnVision Detection System", Peroxidase/DAB, Rabbit, Mouse). Результаты иммуноцитохимического окрашивания оценивали морфометрическим методом на микроскопе "Nikon Eclipse" E400 с помощью цифровой камеры "Nikon" DXM1200 и программного обеспечения "Videotest Morphology 5.2". В каждом случае анализировали 5 полей зрения при увеличении 200. Площадь экспрессии рассчитывали как отношение площади, занимаемой иммунопозитивными клетками, к общей площади клеток в поле зрения и выражали в процентах.

Статистическую обработку полученных данных проводили в программе "Statistica 7.0". Для сравнения и оценки межгрупповых различий использовали непараметрический *U* критерий Манна—Уитни, который является наиболее точным методом для сравнения выборок, включающих около 10-15 элементов. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В культурах клеток эндотелия сосудов, полученных от здоровых доноров, экспрессия маркеров VEGF, Cx37, Cx40 и Ki-67 была в 3-25 раз выше по сравнению с соответствующими показателями для эндотелиоцитов, полученных от пациентов с атеросклерозом (таблица).

В культуре клеток эндотелия здоровых доноров исследуемый пептид способствовал достоверному увеличению только одного из исследуемых маркеров — Cx37, и не влиял на экспрессию белков VEGF, Cx40 и Ki-67. Однако пептид оказывал выраженное протективное действие на культуру эндотелиоцитов, полученных от пациентов с атеросклерозом. Так, при атеросклерозе под действием пептида в концентрациях 4 и 40 мкг/мл экспрессия VEGF в клетках сосудов возрастала в 2 и 3 раза соответственно по сравнению с контролем (таблица).

Интересно, что в зависимости от концентрации пептида изменялось его влияние на экспрессию Cx37 и Cx40 в культуре эндотелиоцитов, полученных от больных с атеросклеротическим поражением сосудов. Пептид в концентрации 4 мкг/мл стимулировал повышение экспрессии Cx40 в 2,3 раза по сравнению с контролем, но не влиял на экспрессию Cx37, тогда как в концентрации

Влияние пептида на площадь экспрессии сигнальных молекул эндотелия сосудов в норме и при атеросклерозе

Маркерный белок	Группа		Площадь экспрессии, %	
			норма	атеросклероз
VEGF	контроль		5.18±1.45	0.20±0.05*
	пептид Lys-Glu-Trp	4 мкг/мл	4.66±1.50	0.43±0.12 ⁺
		40 мкг/мл	5.40±2.16	0.59±0.15 ⁺
Cx37	контроль		9.14±1.43	3.76±1.81*
	пептид Lys-Glu-Trp	4 мкг/мл	7.47±0.51	3.67±1.04
		40 мкг/мл	13.25±3.23 ⁺	6.73±0.93 ⁺
Cx40	контроль		6.44±1.62	2.49±1.05*
	пептид Lys-Glu-Trp	4 мкг/мл	6.19±1.20	6.4±0.80 ⁺
		40 мкг/мл	7.17±1.82	2.51±1.09
Ki-67	контроль		3.43±0.66	0.67±0.11*
	пептид Lys-Glu-Trp	4 мкг/мл	4.40±0.72	0.78±0.15
		40 мкг/мл	4.26±0.62	0.87±0.18

Примечание. $p < 0.05$ по сравнению *с нормой, *с соответствующим контролем.

40 мкг/мл этот пептид вызывал увеличение экспрессии Cx37 в 1.9 раза по сравнению с контролем, но не влиял на синтез Cx40 (таблица). При этом пептид в обеих исследуемых концентрациях не влиял на экспрессию пролиферативного белка Ki-67 в клетках эндотелия, полученных от пациентов с атеросклерозом (таблица).

Полученные данные свидетельствуют о том, что в основе молекулярного механизма атеросклеротического поражения сосудов лежит снижение экспрессии ряда сигнальных молекул, участвующих в межклеточных взаимодействиях эндотелиоцитов (Cx37 и Cx40), ангио- и васкулогенезе (фактор VEGF) и пролиферации (транскрипционный фактор Ki-67).

Исследуемый пептид, с одной стороны, не влияет на экспрессию сигнальных молекул в нормальном эндотелии, а с другой — способствует значительному повышению сниженной при атеросклерозе экспрессии указанных сигнальных молекул. Таким образом, пептид Lys-Glu-Trp, способствующий восстановлению межклеточных взаимодействий и неоваскулогенезу, является перспективным средством для таргетной терапии атеросклеротического поражения сосудов, ИБС и инфаркта миокарда.

ЛИТЕРАТУРА

1. Воевода М.И., Казаринова Ю.Л., Максимов В.Н. и др. // Вестн. аритмол. 2011. № 63. С. 32-35.
2. Патент РФ № 2458935. Средство для коррекции метаболического синдрома / В.В.Малинин // Бюл. № 23 от 20.08.2012.
3. Полянцев А.А., Мозговой П.В., Фролов Д.В., Снугур Г.Л. // Биомед. журн. 2011. Т. 12. С. 410-419.
4. Сергиенко И.В., Семенова А.Е., Масенко В.П. и др. // Кардиология. 2007. Т. 47, № 8. С. 4-7.
5. Торшин И.Ю., Громова О.А. // Трудный пациент. 2008. Т. 6, № 4. С. 5-11.
6. Berliner J.A., Navab M., Fogelman A.M. et al. // Circulation. 1995. Vol. 91, N 9. P. 2488-2496.
7. Coppen S.R., Dupont E., Rothery S., Severs N.J. // Circ. Res. 1998. Vol. 82, N 2. P. 232-243.
8. Dupont E., Ko Y., Rothery S. et al. // Circulation. 2001. Vol. 103, N 6. P. 842-849.
9. Lamarche J., O'Hara G., Philippon F. et al. // Eur. Heart J. 2001. Vol. 22, N 16. P. 1511-1512.
10. Lieb W., Safa R., Benjamin E.J. et al. // Eur. Heart J. 2009. Vol. 30, N 9. P. 1121-1127.
11. Shayanfar N., Mashayekh M., Mohammadpour M. // Acta Med. Iran. 2010. Vol. 48, N 3. P. 142-147.

Получено 19.03.13